

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/82, 15/55, A01H 5/00</b></p>		A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 95/06740</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>9. März 1995 (09.03.95)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP94/02935</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>2. September 1994 (02.09.94)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten: <b>P 43 29 828.1 3. September 1993 (03.09.93) DE</b></p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): <b>MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstrasse 10, D-37073 Göttingen (DE)</b></p> <p>(72) Erfinder; und <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TÖPFER, Reinhard [DE/DE]; Commerstrasse 16, D-50126 Bergheim (DE). MARTINI, Norbert [DE/DE]; Kolibriweg 8, D-50829 Köln (DE). SCHELL, Jozef [BE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 12, D-50829 Köln (DE).</b></p> <p>(74) Anwalt: <b>DRAUDT, Axel, H., Ch.; Maiwald &amp; Partner, Balanstrasse 57, D-81541 München (DE).</b></p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: <b>AU, CA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b></p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: <b>22. Juni 1995 (22.06.95)</b></p>	
<p>(54) Title: <b>MEDIUM CHAIN-SPECIFIC THIOESTERASES</b></p> <p>(54) Bezeichnung: <b>MITTELKETTENSPEZIFISCHE THIOESTERASEN</b></p> <p>(57) Abstract</p> <p>DNA sequences are disclosed that code for a middle chain-specific acyl-[ACP]-thioesterase, as well as alleles and derivatives of said DNA sequence. This DNA may be used to transform plants capable of forming middle chain-specific acyl-[ACP]-thioesterases.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenz. Mit dieser DNA können Pflanzen transformiert werden, die in der Lage sind, mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen zu bilden.</p>			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagascar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Malai	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

### Mittelkettenspezifische Thioesterasen

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen.

Die Thioesterasen sind wesentlich an der Produktion von Fettsäuren in pflanzlichen Organismen beteiligt. Die Fett- säure- und Triacylglyceridbiosynthese lassen sich aufgrund der Kompartimentierung als getrennte Biosynthesen, jedoch im Hinblick auf das Endprodukt, als ein Biosyntheseweg ansehen. Die de novo Biosynthese von Fettsäuren erfolgt in den Plastiden und wird von drei Enzymen bzw. Enzymsystemen katalysiert, d.h. der Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase), der Fettsäuresynthase (FAS) und der Acyl-[ACP]-Thioesterase (TE).

Endprodukte dieser Reaktionsfolge sind in den meisten Organismen entweder Palmitin- ( $C_{16:0}$ ), Stearin- ( $C_{18:0}$ ) und, nach einer Desaturierung, Ölsäure ( $\Delta 9C_{18:1}$ ). Der Acyl-[ACP]-Thioesterase (TE) kommt die Funktion der Kettenlängen- terminierung zu.

Im Cytoplasma dagegen erfolgt am Endoplasmatischen Reticulum die Triacylglyceridbiosynthese im sogenannten "Kennedy Pathway" aus Glycerin-3-Phosphat, das wahrscheinlich durch die Aktivität der Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (G3P-DH) bereitgestellt wird, und Fettsäuren, die als Acyl-CoA- Substrate vorliegen.

In tierischen Systemen (z.B. bei der Ratte) ist die Acyl-[ACP]-Thioesterase ein integraler Bestandteil der FASI und dort für die Termination der Fettsäurebiosynthese verantwortlich. Eine zweite Acyl-[ACP]-Thioesterase (TEII), die

gewebespezifisch exprimiert wird, sorgt jedoch in milchproduzierenden Brustdrüsen der Ratte für eine frühzeitige Termination der Kettenverlängerung bei der Fettsäurebiosynthese und für eine Freisetzung von  $C_{10:0}$  und  $C_{12:0}$  Fettsäuren. Eine Expression dieser TEII in Mausfibroblasten führte in diesen Zellen zu einer Bildung der genannten mittelkettigen Fettsäuren und belegt somit, daß dieses Enzym entscheidend an der Termination der Kettenlänge beteiligt ist. (S.A. Bayley *et al.*, *Bio/Technology* 6, Seiten 1219-1221 (1988)).

Auch in Pflanzen wurden Acyl-[ACP]-Thioesterasen gereinigt und auf ihre Aktivität untersucht. Acyl-[ACP]-Thioesterasen mit Präferenz für die Hydrolyse langkettiger Acyl-[ACP]-Verbindungen wurden aus *Carthamus tinctorius* (T.A. McKeon *et al.*, *J.Biol.Chem.* 257, Seiten 12141-12147 (1982)), *Cucurbita moschata* (H. Imai *et al.*, *Plant.Mol.Biol.* 20, Seiten 199-206 (1992)) und *Brassica napus* (A. Hellyer *et al.*, *Plant.Mol.Biol.* 20, Seiten 763-780 (1992)) gereinigt. Entsprechende cDNAs wurden bereits von *Carthamus tinctorius* (D.S. Knutzon *et al.*, *Plant Physiol.* 100, Seiten 1751-1758 (1992)) und *Brassica napus* (E.S. Loader *et al.*, *Plant.Mol.Biol.*, Vol. 23, Seiten 769 bis 778 (1993)) isoliert. Eine weitere TE mit Spezifität für die Hydrolyse von  $C_{12:0}$ -[ACP] wurde aus *Umbellularia californica* (Kalifornischer Lorbeer) isoliert und von der Aktivität einer  $C_{18:0}$ -[ACP] spezifischen TE getrennt (M.R. Pollard *et al.*, *Art.Biochem.Biophys.* 284, Seiten 306-312 (1991)). In *Cuphea lanceolata* wurde ebenfalls die Aktivität einer mittel- und einer langkettenspezifischen TE nachgewiesen (P. Dörmann *et al.*, *Planta* 189, Seiten 425-432 (1993)).

Ein nur teilweise gereinigtes Enzympräparat einer  $C_{10:0}$ -spezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase aus *Cuphea hookeriana* ist in der WO 91/16421 beschrieben. Wie Messungen von Hydrolyseaktivitäten des Enzyms gegenüber verschiedenen Substraten zeigen, liegen erhebliche Anteile an Aktivitäten vor, die nicht  $C_{10:0}$ -spezifisch sind.

Für die TE aus *Umbellularia californica* wurde eine cDNA, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase codiert, isoliert. Sie führte in transgenen *Arabidopsis thaliana*- und *B. napus*-Pflanzen zur Bildung mittelkettiger Fettsäuren im Samen, insbesondere von Laurinsäure ( $C_{12:0}$ ) und in geringen Mengen Myristinsäure ( $C_{14:0}$ ); (T.A. Voelker *et al.*, *Science* **257**, Seiten 72-74 (1992) und H.M. Davies und T.A. Voelker in Murata, N. and C. Somerville (Herausgeber): *Current Topics in Plant Physiology: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, Vol. 9, Seiten 133-137; American Society of Plant Physiologists, Rockville (1993)).

Es besteht eindeutig ein erhöhter Bedarf an Bereitstellung mittelkettiger Fettsäuren, wie beispielsweise Caprinsäure ( $C_{10:0}$ ), die als Grundstoffe für Weichmacher, Schmierstoffe, Pestizide, Tenside, Kosmetika usw. industriell einsetzbar sind. Eine Möglichkeit zur Bereitstellung dieser Fettsäuren besteht in der Isolation (Extraktion) der Fettsäuren aus Pflanzen, die besonders hohe Gehalte dieser Fettsäuren aufweisen. Die Erhöhung von Gehalten an mittelkettigen Fettsäuren auf klassischem Wege, also durch Züchtung von Pflanzen, die in erhöhtem Maße diese Fettsäuren produzieren, konnte bisher nur bedingt erreicht werden.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, Gene bzw. DNA-Sequenzen zur Verfügung zu stellen, die zur Verbesserung des Ölertrags und zur Produktion von mittelkettigen Fettsäuren in Pflanzen, die selbst nicht zur Herstellung solcher Fettsäuren in der Lage sind oder nur in geringem Maß diese Fettsäuren produzieren, eingesetzt werden können.

Diese Aufgabe wird mit den DNA-Sequenzen gemäß Patentanspruch 1 bzw. den Genen aus den genomischen Klonen gemäß Patentanspruch 6 gelöst.

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen.

Die Erfindung betrifft weiterhin genomische Klone, die DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren und Promotoren sowie Regulatorsequenzen enthalten, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen, Pflanzenteilen und Pflanzenprodukten, bei dem auf gentechnologischem Weg eine DNA-Sequenz, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodiert, übertragen wird.

Die Erfindung betrifft schließlich auch die Verwendung dieser DNA-Sequenz zur Übertragung von Genen für mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen in Pflanzen.

Die Erfindung betrifft zudem noch Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenprodukte, die nach dem oben genannten Verfahren hergestellt werden.

Die Figuren dienen zur Erläuterung der vorliegenden Erfindung. Es zeigen:

**Figur 1** die Darstellung der DNA- bzw. Aminosäuresequenz der degenerierten Oligonukleotide 3532 und 2740;

**Figur 2** die Restriktionskarten der genomischen Klone für die Acyl-[ACP]-Thioesterase ClTEg1, ClTEg16, ClTEg4 und ClTEg7 aus *Cuphea lanceolata*;

**Figur 3** einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von Thioesterasen aus verschiedenen Pflanzen;

**Figur 4** funktionelle Teile aus binären Vektoren zur Expression der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. Gene aus den genomischen Klonen in transgenen Pflanzen;

**Figur 5** das Gaschromatogramm von in unreifem Rapssamen enthaltenen Fettsäuren (pNBM99-2TE);

**Figur 6** das Gaschromatogramm von in unreifem Tabaksamen enthaltenen Fettsäuren (pNBM99-2TE);

**Figur 7** das Gaschromatogramm von in reifem Rapssamen enthaltenen Fettsäuren (pNBM99-TEg1); und

**Figur 8** das Gaschromatogramm von in reifem Rapssamen enthaltenen Fettsäuren (pNBM99-TEg16).

Es ist selbstverständlich, daß im Rahmen der Erfindung auch allelische Varianten und Derivate der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen erfaßt sind, unter der Voraussetzung, daß diese modifizierten DNA-Sequenzen und Gene für mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen kodieren. Zu den allelischen Varianten und Derivaten zählen beispielsweise Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Inversionen oder Additionen der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen sowie die Gene aus den genomischen Klonen kodieren für mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen, die die Bildung von C<sub>8:0</sub> bis C<sub>14:0</sub>-Fettsäuren katalysieren. Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf C<sub>10:0</sub>-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen oder im wesentlichen C<sub>10:0</sub>-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen und C<sub>14:0</sub>-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen oder im wesentlichen C<sub>14:0</sub>-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen, die bei der Fettsäuresynthese verantwortlich für die Bildung von Caprinsäure bzw. Myristinsäure sind.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Genen, die für mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen kodieren, ist jedes Pflanzenmaterial geeignet, das diese Thioesterasen in ausreichender Menge produziert. Als besonders geeignetes Ausgangsmaterial hat sich in der vorliegenden Erfindung die in Mittelamerika beheimatete Pflanze Cuphea lanceolata erwiesen. Die Samen dieser Pflanze enthalten 83% Caprinsäure.

Zur Isolierung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen wurde eine cDNA-Bank aus Cuphea lanceolata (Wildtyp) mittels einer durch PCR (Polymerase Chain Reaction) hergestellten Hybridisierungssonde, PCR42, nach Genen für mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen durchsucht. Auf diese Weise wurden die cDNA-Klone ClTE13, ClTE5 und ClTE12 isoliert.

Die erhaltenen cDNAs wurden in üblicher Weise vollständig doppelsträngig sequenziert. Die ClTE13-cDNA umfaßt als ApaI-Eco RI-Fragment 1494 bp und enthält das vollständige Strukturgebnis für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase. Die ClTE13-cDNA kodiert für ein Protein mit 414 Aminosäuren einschließlich eines abgeleiteten Transitpeptids mit 111 Aminosäuren. Als SEQ ID NO:1 im Sequenzprotokoll ist die vollständige DNA-Sequenz des 1494 bp cDNA-Fragments mit der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz wiedergegeben. Der kodierende Bereich erstreckt sich von Position 83 bis Position 1324 der DNA-Sequenz. Das offene Leseraster beginnt an Position 83 mit dem Startkodon "ATG", welches für die Aminosäure Methionin kodiert und endet an Position 1324 mit dem Stopkodon "TAG". Das abgeleitete Molekulargewicht des reifen Proteins beträgt 34 kDa.

Die DNA-Sequenzanalyse der beiden weiteren cDNAs ClTE5 und ClTE12 hat ergeben, daß diese nicht das vollständige Strukturgebnis einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase enthalten. Die DNA-Sequenzen der genannten cDNAs mit den daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3 aufgeführt. Die

ClTE5-cDNA als Eco RI-XhoI-Fragment hat eine Länge von 1404 bp und kodiert gemäß dem offenen Leseraster für ein Protein mit 375 Aminosäuren, wobei 34 Aminosäuren des Transitpeptids fehlen im Vergleich zur abgeleiteten Aminosäuresequenz zur ClTE13. Die ClTE12-cDNA hat als Eco RI-XhoI-Fragment, randständige XhoI-Schnittstelle, eine Länge von 1066 bp und kodiert gemäß dem offenen Leseraster für ein Protein mit 287 Aminosäuren, wobei 20 Aminosäuren des reifen Proteins und das Transitpeptid fehlen.

In der nachfolgend angegebenen Tabelle I wird der Homologiegrad bzw. Identitätsgrad der Acyl-[ACP]-Thioesterase-Aminosäuresequenzen der reifen Proteine der ClTE5- und ClTE13-cDNAs (abgeleitet aus der DNA-Sequenz) aus *Cuphea lanceolata*, CtTE2-1 und CtTE5-2 aus *Carthamus tinctorius* und UcTE aus *Umbellularia californica* verglichen.

Tabelle I

	CITE5	CITE13	CtTE2-1	CtTE5-2	UcTE	Prozent Identität
CITE5		91,3%	44,8%	48,2%	57,0%	
CITE13	96,0%		44,2%	45,7%	57,9%	
CtTE2-1	67,1%	67,6%		82,5%	39,7%	
CtTE5-2	71,1%	69,5%	91,1%		41,6%	
UcTE	75,1%	76,3%	63,8%	62,7%		
Prozent Homologie						

Der Vergleich der TE-Aminosäuresequenz von ClTE13 mit der Thioesterase aus *U. californica* (UcTE) zeigt mit 57,9% identischen Aminosäuren eine recht hohe Übereinstimmung, die größer ist als diejenige zu den langkettenspezifischen Thioesterasen aus *C. tinctorius* (CtTE2-1 und CtTE5-2). So zeigt ebenfalls die Thioesterase der ClTE5 mit einer Identität von 57,0% zu UcTE einen recht hohen Identitätsgrad.

Figur 3 zeigt einen Aminosäuresequenzvergleich von Thioesterasen aus Pflanzen. Die Sequenzen der reifen Proteine (Ausnahme: ClTE12, -20 Aminosäuren) sind von den entsprechenden Thioesterase (TE) cDNAs aus *Carthamus tinctorius* = Ct, *Cuphea lanceolata* = Cl, *Brassica napus* = Bn und *Umbellularia californica* = Uc abgeleitet. PCR42 ist das PCR-Produkt, das zum Screenen der cDNA-Bank verwendet wurde. Die Lücke zwischen den Positionen 374 und 393 (ca. 20 Aminosäuren) tritt nur bei den mittelkettenspezifischen Thioesterasen auf und liegt nahe vor dem einzigen über alle Sequenzen konservierten Cystein (Position 359), dem mutmaßlichen aktiven Cystein-Rest. Durch Veränderung der Sequenzabschnitte zwischen den genannten Positionen und andere, siehe unten, kann durch Genengineering Einfluß auf die Kettenlängenspezifität der Thioesterasen genommen werden.

Des weiteren wurden genomische Klone aus *Cuphea lanceolata* isoliert und charakterisiert, die das vollständige Strukturen einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase sowie dazugehörige Regulatorsequenzen (wie Promotoren und Terminatoren) enthalten. Das bedeutet also, daß sie vollständige Transkriptionseinheiten bilden. Beim Screenen einer genomischen DNA-Bank von *Cuphea lanceolata* mit der ClTE5-cDNA als Sonde wurden 23 genomische Klone isoliert. Die genomischen Klone ClTEg1, ClTEg16, ClTEg4 und ClTEg7 sind in Figur 2 gezeigt und anhand einer Restriktionsanalyse mit verschiedenen Restriktionsenzymen charakterisiert. Es handelt sich dabei um DNA-Fragmente, die eine Größe von 12,7 kb für ClTEg1, 17,4 kb für ClTEg16, 13,5 kb für ClTEg4 und 14,7 kb für ClTEg7

aufweisen. Die Restriktionskartierung hat ergeben, daß die gezeigten genomischen Klone vier verschiedenen Klassen von Genen zuzuordnen sind. Es ist aufgrund von Sequenzdaten festgestellt worden, daß die cDNA ClTE5 dem Gen aus dem genomischen Klon ClTEg4, die ClTE12-cDNA dem Gen aus dem genomischen Klon ClTEg1, die ClTE13-cDNA dem Gen aus dem genomischen Klon ClTEg7 und das PCR-Produkt PCR42 dem Gen aus dem genomischen Klon ClTEg16 entsprechen.

Anhand der beschriebenen cDNA-Sequenzen wurden interne, am 5'-Ende liegende Sequenzprimer abgeleitet. Mit diesen wurden an den genomischen Klonen als Matrize Sequenzdaten gewonnen, die Aufschluß über den Beginn des kodierenden Bereichs und damit auch über die Begrenzung der Promotoren der Thioesterase-Gene gaben. Aufgrund dieser diagnostischen Sequenzabschnitte der genomischen Klone ClTEg1, ClTEg16, ClTEg4 und ClTEg7 im Bereich des jeweils kleinsten hybridisierenden Fragmentes (siehe schwarze Balken in Abbildung 2) konnte neben der Identität als Gene für mittelkettenspezifische Thioesterasen im Vergleich zur Aminosäuresequenz zur *U. californica* Thioesterase auch die Vollständigkeit der Thioesterase-Gene als Transkriptionseinheiten festgestellt werden.

Durch DNA-Sequenzanalyse von ausgewählten Sequenzabschnitten der genomischen Klone ClTEg1, ClTEg4, ClTEg7 und ClTEg16 wurden die Thioesterase-Gene identifiziert. Die sequenzierten Bereiche sind als weiße Balken unter den in Figur 2 gezeigten Klonen erkennbar. Alle Gene bestehen aus sieben Exons, wobei das erste Exon im nicht translatierten Bereich der mRNA liegt. Auf einem 4098 bp DNA-Fragment des Klons ClTEg1 befindet sich das Strukturgebnis einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioestrase, siehe SEQ ID NO:4 im Sequenzprotokoll. Der kodierende Bereich beginnt mit Exon II an Position 1787 und endet mit Exon VII an Position 3941. Das Strukturgebnis einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase ist auf einem 4643 bp DNA-Fragment des Klons ClTEg7 enthalten. Wie aus SEQ ID NO:6 im Sequenzprotokoll zu entnehmen ist, beginnt der

kodierende Bereich an Position 773 mit Exon II und endet mit Exon VII an Position 3118. Der genomische Klon ClTEg16 enthält auf einem 5467 bp DNA-Fragment das Strukturgen einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase, siehe SEQ ID NO:7 im Sequenzprotokoll. Der kodierende Bereich beginnt mit Exon II an Position 3284 und endet mit Exon VII an Position 5275. Der kodierende Bereich für das Strukturgen einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase ist für den genomischen Klon ClTEg4 nur unvollständig vorhanden. SEQ ID NO:5 im Sequenzprotokoll zeigt auf einem 928 bp DNA-Fragment das Exon II an den Positionen 1 bis 502 sowie das unvollständige Intron II an den Positionen 503 bis 928.

Die Strukturgene für die in den genomischen Klonen ClTEg1, ClTEg7 und ClTEg16 nachgewiesenen mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterasen umfassen jeweils sieben Exons von fast gleicher Größe, wobei ebenfalls das Exon II der Thioesterase des Klons ClTEg4 in den Größenbereich der Exons II der übrigen Thioesterasen fällt. Dem Intron I aller Gene kommen möglicherweise bei der Genexpression genregulatorische Funktionen zu.

Der genomische Klon ClTEg4 wurde unter der Nummer DSM 8493 und der genomische Klon ClTEg7 unter der Nummer DSM 8494 am 27. August 1993 bei der DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig hinterlegt.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren können unter Anwendung gentechnologischer Verfahren (in Form von anti-sense oder Überexpression) in Pflanzen zur Produktion dieser Fettsäuren in diesen Pflanzen eingeführt bzw. übertragen werden. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen werden, soweit sie nicht als vollständige Transkriptionseinheit vorliegen, vorzugsweise zusammen mit geeigneten Promotoren,

insbesondere in rekombinanten Vektoren, wie beispielsweise binäre Vektoren, in die Pflanzen eingeführt.

Die genomischen Klone ClTEg1, ClTEg16, ClTEg4 und ClTEg7 können als eigene vollständige Transkriptionseinheiten (enthaltend Promotor, Strukturen und Terminator) zur Transformation von Pflanzen, wobei mittelkettenspezifische Fettsäuren in den Speicherlipiden akkumuliert werden, verwendet werden. Die Ausbeute an mittelkettigen Fettsäuren kann durch Kreuzung und damit Kombination der Thioesterasegene optimiert werden. Eine Optimierung kann dahingehend stattfinden, daß der Gehalt an neu eingebrachten Fettsäuren erhöht wird oder verschiedene neue Fettsäuren gebildet werden.

Alle Arten von Pflanzen können für diesen Zweck transformiert werden. Es werden bevorzugt solche Pflanzen transformiert, die eine erhöhte Produktion von mittelkettenspezifischen Fettsäuren aufweisen sollen und solche Pflanzen, die natürlicherweise nicht diese Fettsäuren synthetisieren. In diesem Zusammenhang seien Ölpflanzen, wie beispielsweise Raps, Sonnenblume, Lein, Ölpalme und Soja genannt.

Die gentechnologische Einführung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren, kann mit Hilfe üblicher Transformationstechniken durchgeführt werden. Solche Techniken umfassen Verfahren wie direkten Gentransfer, wie beispielsweise Mikroinjektion, Elektroporation, Particle gun, das Quellen von Pflanzenteilen in DNA-Lösungen, Pollen- oder Pollenschlauchtransformation, virale Vektoren und Liposomen-vermittelten Transfer sowie die Übertragung von entsprechenden rekombinanten Ti-Plasmiden oder Ri-Plasmiden mittels Agrobacterium tumefaciens und die Transformation durch Pflanzenviren.

In der vorliegenden Erfindung wurde zur Transformation die ClTE13-cDNA als ApaI-Eco RI-Fragment erstens hinter dem konstruierten Doppelpromotor der 35S RNA aus dem Cauliflower

Mosaik Virus (p35S/Δp35S) in den binären Vektor pRE9 (pNBM99-3TE) eingeführt, zweitens wurde dieses Fragment hinter den samenspezifischen ACP23-Promotor aus Raps in den binären Vektor pRE1 eingeführt (pNBM99-2TE). Des weiteren wurde ein XbaI-Fragment (7,3 kb) aus dem genomischen Klon ClTEg1 und ein SalI-Eco RI-Fragment (6 kb) aus dem genomischen Klon ClTEg16 in pRE1 eingeführt. Daraus resultieren die binären Vektoren pNBM99-TEg1 und pNBM99-TEg16. Das TE-Gen von ClTEg1 befindet sich in 3'-5'-Orientierung und das von ClTEg16 in 5'-3'-Orientierung in pRE1. Die funktionellen Teile der somit erhaltenen Expressionsvektoren sind in Figur 4 gezeigt.

Die in Figur 4 aufgeführten Abkürzungen haben folgende Bedeutungen:

RB und LB = rechte und linke Border der Transfer-DNA.  
pACP23 = Promotor des Acyl-Carrier-Protein Gens 23 aus Raps  
ClTE13 = cDNA 13 aus Cuphea lanceolata  
tnos = Terminator des Nopalinsynthasegens aus Agrobacterium tumefaciens  
NPTII = Neomycinphosphotransferasegen II  
p35S = Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaikvirus  
t35S = Terminator der 35S RNA des Cauliflower Mosaikvirus  
35s = Minimalpromotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus

Durch Transformation der erfindungsgemäßen cDNA sowie der Gene aus den genomischen Klonen wurde die Mittelkettenspezifität der Thioesterasen untersucht. Geeignete Pflanzenmaterialien sind beispielsweise Raps und Tabak, da diese Pflanzen nur in der Lage sind, längerkettige Fettsäuren ab C<sub>16:0</sub> zu produzieren.

Dazu wurden die Expressionsvektoren pNBM99-TEg1 bzw. pNBM99-TEg16 mittels Agrobacterium unabhängig voneinander in Raps transformiert. Der Expressionsvektor pNBM99-TEg1 wurde unter der Nummer DSM 8477 und der Expressionsvektor pNBM99-TEg16 unter der Nummer DSM 8478 am 27. August 1993 bei der DSM-

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,  
Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig hinterlegt.

Die Expressionsvektoren pNBM99-2TE und pNBM99-3TE wurden mit Agrobacterium tumefaciens unabhängig voneinander in Tabak transformiert.

Die transformierten Raps- und Tabakpflanzen wurden dann auf ihren Gehalt an mittelkettigen Fettsäuren untersucht. Dazu wurden reifende Samen durch gaschromatographische Untersuchung analysiert. Die Figuren 5 und 6 zeigen das Gaschromatogramm von Fettsäureextrakten aus transgenen Rapssamen bzw. Tabaksamen, die mit der Konstruktion pNBM99-2TE transformiert wurden.

Aus den Gaschromatogrammen ist ersichtlich, daß transgener Raps wie auch transgener Tabak Caprinsäure (Peak C<sub>10:0</sub>) produzieren. Daraus folgt, daß die cDNA ClTE13 und das Gen aus dem genomischen Klon ClTEg7 (siehe oben) eine Thioesterase kodieren, die C<sub>10:0</sub>-spezifisch oder im wesentlichen C<sub>10:0</sub>-spezifisch ist.

In weiteren Untersuchungen an transgenen reifen Rapssamen, die mit den Expressionsvektoren pNBM99-TEg1 bzw. pNBM99-TEg16 transformiert worden sind, konnte festgestellt werden, daß im Gaschromatogramm der Fettsäureextrakte im Fall des Gens aus dem genomischen Klon ClTEg1 (Figur 7) 1,7% Caprinsäure (C<sub>10:0</sub>) und 0,4% Caprylsäure (C<sub>8:0</sub>) und im Fall des Gens aus dem genomischen Klon ClTEg16 (Figur 8) 5,4% Myristinsäure (C<sub>14:0</sub>) gebildet werden. Die nachfolgende Tabelle II zeigt die Änderung des Fettsäuremusters der untersuchten transgenen Rapspflanzen. Die Angaben beziehen sich auf %-Anteil an Fettsäure im reifen Samen.

Tabelle II

Konstrukt	$C_8$	$C_{10}$	$C_{12}$	$C_{14}$	$C_{16}$	$C_{18,0}$	$C_{18,1}$	$C_{18,2}$	$C_{18,3}$	$C_{20,0}$
Kontrolle	-	-	-	-	3,0	2,3	76,5	9,9	6,0	0,8
pNBM99-TEg1	0,4	1,7	-	-	3,4	2,2	75,4	8,2	6,5	0,8
pNBM99-TEg16	-	-	-	5,4	13,4	1,9	56,6	13,7	7,1	0,7

Daraus folgt, daß das Gen aus dem genomischen Klon ClTEg1 und die cDNA ClTE12 (siehe oben) für eine  $C_{10:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen  $C_{10:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase und das Gen aus dem genomischen Klon ClTEg16 für eine  $C_{14:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen  $C_{14:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen in Figur 3 fällt auf, daß der  $C_{10}/C_{14}$ -Unterschied von ClTEg1 und ClTEg16 auf geringe Sequenzunterschiede "RR" (Positionen 360/361), "M" (Position 371), "KE" (Positionen 395/396) und "D" (Position 398), etc. zurückgeführt werden kann. Es befinden sich zudem eine Lücke (fünf Aminosäuren) und Aminosäureaustausche im Bereich der Positionen 127 bis 135. Diese Regionen könnten einen Einfluß auf die Kettenlängenbegrenzung haben.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und die Gene aus den isolierten genomischen Klonen aus *Cuphea lanceolata* sind in hervorragender Weise geeignet, transformierten Pflanzen die Fähigkeit zu verleihen, mittelkettenspezifische Fettsäuren zu bilden. Das bedeutet, daß ein vollfunktionsfähiges Gen für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase übertragen werden kann. In gaschromatographischen Untersuchungen von transgenen Raps und Tabak wurde die Bildung von Caprinsäure und Myristinsäure durch Übertragung von Genen für eine  $C_{10:0}$ - bzw.  $C_{14:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen  $C_{10:0}$ - bzw.  $C_{14:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase nachgewiesen. Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäße cDNA sowie die Gene aus den gezeigten genomischen Klonen als pflanzliche Gene nicht zu Schwierigkeiten in der Verträglichkeit in Raps und Tabak führen. Die ordnungsgemäße Kompartimentierung ist aufgrund der vorhandenen Transitpeptide gewährleistet. Für eine regulierte Expression der ClTE13-cDNA kann ein samenspezifisch exprimierender Promotor benutzt werden und die Gene aus den gezeigten genomischen Klonen werden selbst durch die eigenen Promotoren gewebespezifisch reguliert. Positionseffekte können durch die notwendige Anzahl von Transformanten ausgeglichen werden.

Somit eignen sich die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in Form der präsentierten cDNAs als auch in Form der isolierten Gene der gezeigten genomischen Klone zur Produktion von mittelkettenspezifischen Fettsäuren in transgenen Pflanzen, vorzugsweise Ölpflanzen. Eine Optimierung des Gehaltes an mittelkettenspezifischen Fettsäuren kann durch zusätzlichen Transfer von Komponenten des Fettsäuresynthesesystems, wie z.B. DNA-Sequenzen für ACP2, einer spezifischen KAS, Ketoreduktase und Enoylreduktase, zum Beispiel aus *Cuphea lanceolata*, in Raps, erfolgen. Darüber hinaus ist zu erwarten, daß die cytoplasmatisch lokalisierte LPA-AT (Lysophosphatid-säure Acyltransferase) z.B. aus *Cuphea lanceolata* in Raps eine deutliche Steigerung des Gehalts an mittelkettigen Fettsäuren in den Triacylglyceriden mit sich bringt.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

#### Beispiele

Das im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Pflanzenmaterial bestand aus den Arten *Brassica napus* (Cruciferae) (Raps), *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) (Tabak) und *Cuphea lanceolata* (Lythraceae) (lanzettblättriges Köcherblümchen oder Höckerblümchen). Zur Transformation wurde die Sommerrapssorte Drakkar und die Tabaklinie Petit Havanna SR1 verwendet.

#### Beispiel 1

##### Herstellung von cDNAs der Acyl-[ACP]-Thioesterase aus *Cuphea lanceolata*

Zunächst wurde eine cDNA-Bank aus *Cuphea lanceolata* (Wildtyp) hergestellt. Die cDNA-Bank wurde nach den Angaben des Herstellers (Stratagene) mit Hilfe des cDNA ZAP®-Synthese Kits hergestellt. Als Ausgangsmaterial zur Synthese der cDNAs diente polyA<sup>+</sup>-mRNA aus isolierten, etwa zwei bis drei Wochen alten unreifen Embryonen. Die auf diese Weise gewonnene cDNA-

Bank hat eine Größe von  $9,6 \times 10^5$  rekombinanten Phagen mit einem Anteil von etwa 50% Klonen, deren Insertionen 500 bp übersteigen.

Zum Screenen der oben beschriebenen cDNA-Bank wurde eine spezifische Hybridisierungssonde für die Acyl-[ACP]-Thioesterase hergestellt. Dazu wurden zunächst geeignete degenerierte Oligonukleotide benötigt. Bei Voelker *et al* (1992), *Science* 257, Seiten 72-74 ist eine DNA-Sequenz einer pflanzlichen Acyl-[ACP]-Thioesterase wiedergegeben. Von einigen Bereichen der Sequenz, die möglichst wenig degeneriert sind, wurden Oligonukleotidprimer abgeleitet und synthetisiert. Der Primer 3532, der den Aminosäuren 277 bis 284 der Acyl-[ACP]-Thioesterase von *Umbellularia californica* entspricht, ist in PCR-Reaktionen in Verbindung mit dem Primer 2740 (ein modifizierter Oligo-dT-Primer mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bst*BI, *Bam*HI, *Hind*III und *Sal*I) geeignet zur Amplifikation einer spezifischen Hybridisierungssonde.

Figur 1 zeigt die Sequenzen der für die PCR-Reaktionen verwendeten synthetischen Oligonukleotidprimer 3532 und 2740. Die Orientierung der Oligonukleotidprimer ist beim Primer 3532 von 5' bis 3', beim Primer 2740 von 3' bis 5'.

Ausgehend von 1  $\mu$ g poly A<sup>+</sup>-RNA wurde mit reverser Transkriptase (Boehringer Mannheim GmbH) aus Avian Myeloblastosis Virus (AMV) während 30 Minuten bei einer Temperatur von 37°C eine cDNA-Synthese durchgeführt. Dazu wurde der in Figur 1 wiedergegebene 3'-Oligonukleotidprimer (2740) zur Synthese der spezifischen Hybridisierungssonde eingesetzt. Nach Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Erhitzen während 5 Minuten bei einer Temperatur von 95°C wurde in dem gleichen Reaktionsansatz die PCR-Reaktion mit 50 pMol Endkonzentration je Primer und 4 Einheiten Ampli-Taq<sup>®</sup>-Polymerase (Perkin Elmer Cetus) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten unter den folgenden Bedingungen: a) Pufferbedingungen: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% Gelatine und 5 mM dNTPs,

b) Reaktionsdauer und -temperaturen: 3 Minuten bei 92°C zum erstmaligen Denaturieren, dann 25 bis 30 Temperaturzyklen mit: 2 Minuten bei 92°C zum Denaturieren, 2 Minuten bei 50°C zum Annealen der Oligonukleotide und 2,5 Minuten bei 72°C zur Amplifikation der DNA sowie abschließend 7 Minuten bei 72°C, um eine vollständige Synthese der letzten Syntheseprodukte zu erreichen.

Die entstandenen Amplifikationsprodukte wurden dann kloniert. Dazu wurde überstehende einzelsträngige DNA der PCR-Produkte mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt und anschließend mit Polynukleotidkinase phosphoryliert (Sambrook et al., A Laboratory Manual, 2nd edn., (1989)). Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt gemäß Standardprotokollen nach Sambrook et al. (supra) durch Agarose-Gelelektrophorese, Gelelution, Extraktion mit Phenol/Chloroform und abschließender Fällung mit Isopropanol. Die auf diese Weise gereinigte DNA wurde in SmaI gespaltene pBluescript®-Vektor-DNA ligiert und kloniert.

Anschließend wurde das klonierte PCR-Fragment nach der Methode von Sanger et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 74, Seiten 5463-5467 sequenziert. Die DNA-Sequenzierung erfolgte teilweise radioaktiv mit Hilfe des Sequencing®-Kits bzw. mit Hilfe eines Pharmacia Automated Laser Fluorescent A.L.F.®-DNA-Sequenziergeräts. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Computer Software der University of Wisconsin Genetics Computer Group (Devereux et al., Nucl.Acids Res. 12, Seiten 387-395 analysiert.

Wie aus der als SEQ ID NO:8 im Sequenzprotokoll gezeigten Sequenz des 530 bp Acyl-[ACP]-Thioesterase-PCR-Produkts, PCR42, zu erkennen ist, konnte ein PCR-Produkt mit signifikanter Homologie zur Ausgangssequenz synthetisiert werden. Unter der DNA-Sequenz ist die korrespondierende Aminosäure dargestellt.

Das oben beschriebene 530 bp große PCR-Produkt wurde als Sonde zur Isolation von Acyl-[ACP]-Thioesterase-CDNAs verwendet.

Dazu wurde die oben beschriebene cDNA-Bank mit dem PCR-Produkt gescreened und 11 cDNAs isoliert, die aufgrund ihrer Sequenzen in drei Klassen eingeteilt werden können.

In diesem Zusammenhang wurden die cDNA-Klone ClTE13, ClTE5 und ClTE12 isoliert, die jeweils eine der drei Klassen repräsentieren. Ihre DNA-Sequenzen sowie die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind als SEQ ID NO:1,2 und 3 im Sequenzprotokoll dargestellt.

#### Beispiel 2

#### Herstellung von genomischen Klonen der Acyl-[ACP]-Thioesterase aus Cuphea lanceolata

Hierzu wurde genomische DNA aus jungen Blättern von Cuphea lanceolata isoliert (S.L. Della Porta, J. Wood und J.B. Hicks, A plant DNA minipreparation: Version II, Plant.Mol.Biol.Rep.1, Seiten 19-21 (1983)). Die DNA wurde dann partiell mit dem Restriktionsenzym Sau3A gespalten, wonach DNA-Fragmente der Größenordnung zwischen 11000 bp und 19000 bp in den mit XbaI gespaltenen Vektor FIX II (Stratagene) kloniert wurden, nachdem die beteiligten Schnittstellen jeweils mit zwei Nukleotiden partiell aufgefüllt worden waren. Die nichtvervielfältigte genomische DNA-Bank repräsentierte 5,4 mal das Genom von Cuphea lanceolata. Mit der ClTE5-cDNA als Sonde wurden dann aus dieser Bank 103 hybridisierende Phagen isoliert, 40 davon weiter aufgereinigt und 23 kartiert. Diese lassen sich in vier Klassen einteilen. Hierzu wird auf Figur 2 verwiesen, die die genomischen Klone ClTEg1, ClTEg16, ClTEg4 und ClTEg7, welche unterschiedlichen Klassen zugeordnet werden, zeigen. Geeignete DNA-Fragmente der genomischen Klone wurden sequenziert. Ihre DNA-Sequenzen sowie die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind als SEQ ID NO:4,5,6 und 7 im Sequenzprotokoll wiedergegeben.

Beispiel 3Transformation von Raps und Tabak

Es wurden geeignete Expressionsvektoren hergestellt. Dazu wurde ein chimäres Gen bestehend aus der ClTE13-cDNA, dem Promotor ACP23 und dem Terminator tnos in den binären Vektor pRE1 inseriert. Daraus resultiert der Vektor pNBM99-2TE. Der Vektor pNBM99-3TE wurde hergestellt, indem die ClTE13-cDNA nach dem konstruierten Doppelpromotor der 35S RNA aus dem Cauliflower Mosaic Virus (p35S/Δp35S) in den binären Vektor pRE9 eingeführt wurde. Weitere Expressionsvektoren wurden hergestellt unter Verwendung der genomischen Klone ClTEg1 und ClTEg16 und dem binären Vektor pRE1. Die somit erhaltenen Expressionsvektoren wurden mit pNBM99-TEg1 und pNBM99-TEg16 bezeichnet.

Die Transformation von Raps erfolgte mittels Agrobacterium tumefaciens nach dem Protokoll von De Block et al., Plant Physiol. 91, Seiten 694-701 ausgehend von Hypocotylstücken. Dabei wurde der Agrobacterienstamm GV3101 C58C1 Rif<sup>r</sup> (Van Larebeke et al., Nature 252, Seiten 169-170 (1974)) mit dem Ti-Plasmid pMP90RK (C.Koncz, J. Schell, Mol.Gen.Genet. 204, Seiten 383-396 (1986)) und die oben genannten Expressionsvektoren verwendet. Die Selektion auf Kanamycin-Resistenz erfolgte mit 50 µg (Medium A5), später mit 15 µg Kanamycin (Monosulphat, Sigma K-4000) pro Milliliter Medium (Medium A6 und A8). Die Transformationsrate betrug 10%, bezogen auf die Anzahl ausgelegter Hypocotylstücke. Sie basiert auf der Verifizierung der Transformation mittels Southern-Blot (Sambrook et al., supra.) bzw. (PCR-Edwards et al., Nucl.Acids Res. 19, Seite 1349, (1991)).

Die Transformation von Tabak erfolgte mit dem oben genannten Vektorsystem nach dem "Leaf-Disk" Transformationsverfahren nach R.B. Horsch et al., Pant.Mol.Biol. 20, Seiten 1229-1231, (1985)).

Die Analyse der Fettsäuren in den transformierten Pflanzen wurde nach der Methode von W. Thies, Z. Pflanzenzüchtung 65, Seiten 181-202 (1971) und W. Thies, Proc. 4th Int.Rape Seed Con, 4.-8. Juni, Gießen, Seiten 275-282 (1974) mit Hilfe eines Hewlett-Packard Gaschromatographen (Modell HP5890 Serie II mit FID) und einer 10 m langen Kapillarsäule (FS-FFAP-CB-0,25 von CS-Chromatographie-Service GmbH, Langerwehe) durchgeführt. Mit Wasserstoff als Trägergas erfolgte die Trennung der Fettsäure-methylester in einem Temperaturgradienten von 140°C bis 208°C bei einem Temperaturanstieg von 20°C pro Minute. Nach Erreichen der Endtemperatur von 208°C verlief die Trennung isotherm über sieben Minuten. Injektor und Detektor wurden konstant bei 250°C betrieben.

Sollten in irgendeiner Weise molekularbiologische Arbeiten nicht hinreichend beschrieben sein, so wurden diese nach Standardmethoden, wie bei Sambrook et al, supra, beschrieben, durchgeführt.

Patentansprüche

1. DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen.
2. DNA-Sequenzen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Pflanzen isoliert sind.
3. DNA-Sequenzen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Cuphea lanceolata isoliert sind.
4. DNA-Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine  $C_{10:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen  $C_{10:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren.
5. DNA-Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine  $C_{14:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen  $C_{14:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren.
6. Genomische Klone, die das vollständige Gen für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase und die Allele sowie Derivate dieses Gens enthalten.
7. Genomische Klone nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das vollständige Gen neben dem Strukturgen die Promotorsequenz und andere Regulatorsequenzen umfaßt.
8. Genomische Klone nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus genomischer Pflanzen-DNA isoliert sind.
9. Genomische Klone nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzen-DNA von Cuphea lanceolata stammt.

10. Genomischer Klon nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase eine  $C_{10,0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen  $C_{10,0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase ist.
11. Genomischer Klon nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase eine  $C_{14,0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen  $C_{14,0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase ist.
12. Genomische Klone ClTEg4 (DSM 8493) und ClTEg7 (DSM 8494).
13. Plasmide pNBM99-TEg1 (DSM 8477) und pNBM99-TEg16 (DSM 8478).
14. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen, Pflanzenteilen und Pflanzenprodukten, die Fettsäuren mittlerer Kettenlänge produzieren, bei dem eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder ein aus den genomischen Klonen oder Plasmiden nach einem der Ansprüche 6 bis 13 stammendes Gen auf gentechnologischem Weg übertragen wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenprodukte Caprinsäure ( $C_{10,0}$ ) oder im wesentlichen Caprinsäure ( $C_{10,0}$ ) produzieren.
16. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenprodukte Myristinsäure ( $C_{14,0}$ ) oder im wesentlichen Myristinsäure ( $C_{14,0}$ ) produzieren.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich DNA-Sequenzen, die für ACP2, eine spezifische KAS, Ketoreduktase und Enoylreduktase und gegebenenfalls Lysophosphatidsäure-Acyltransferase kodieren, übertragen werden.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz bzw. DNA-Sequenzen und die Gene durch Mikroinjektion, Elektroporation, Particle gun, das Quellen von Pflanzenteilen in DNA-Lösungen, Pollen- oder Pollenschlauchtransformation, Übertragung von entsprechenden rekombinanten Ti-Plasmiden oder Ri-Plasmiden von Agrobacterium tumefaciens, Liposomen-vermittelten Transfer oder durch Pflanzenviren übertragen wird bzw. werden.
19. Verwendung einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines aus den genomischen Klonen oder Plasmiden nach einem der Ansprüche 6 bis 13 stammenden Gens zur Übertragung von Genen für mittelketten-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen in Pflanzen.
20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase eine C<sub>10:0</sub>-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen C<sub>10:0</sub>-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase ist.
21. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase eine C<sub>14:0</sub>-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen C<sub>14:0</sub>-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase ist.
22. Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenprodukte hergestellt nach einem Verfahren der Ansprüche 14 bis 18.

1/16

Fig. 1

## Acyl[ACP]-Thioesterase

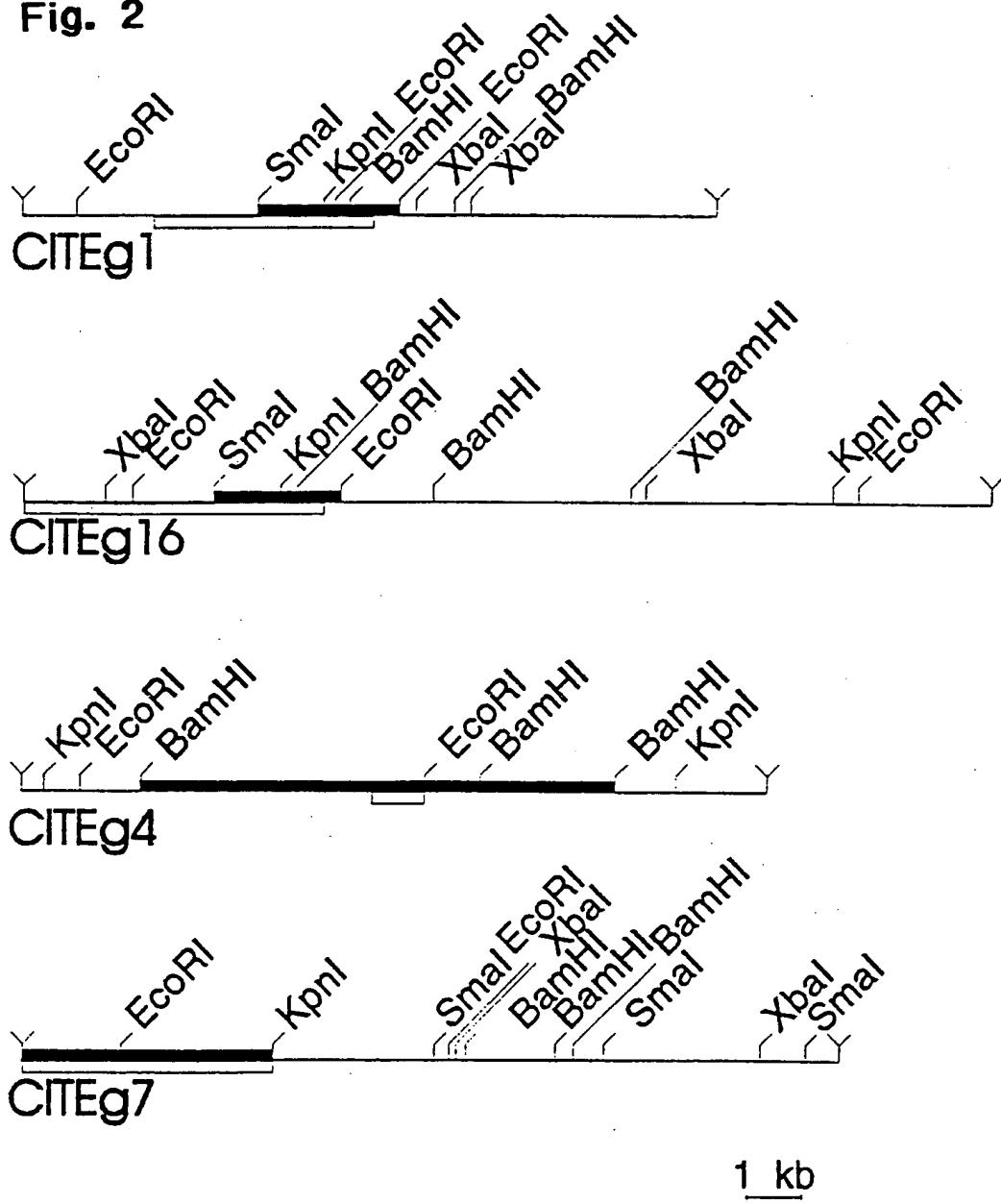
5' Primer Number 3532

5'  $\begin{matrix} W & N & D & L & D & V & N & Q \\ TGG & AAC & GAC & CTI & GAC & GTI & AAC & GA \\ T & T & T & T & T & T & T & T \end{matrix}$ 

3' Primer Number 2740

3'  $T_{18} CGAAGGATCCAAGCTTGTGACT$

2/16

**Fig. 2**

3  
Ei

		50	3/16
Ctt <sub>e2</sub> _1	.....	.....	.....
Ctt <sub>e5</sub> _2	.....	.....	.....
Bnt <sub>e2</sub>	.....	.....	.....
C1te13	MVATAASSAF	FPLPSPDTSS	RPGKLGNGSS
C1teg7	MVATAASSAF	FPLPSPDTSS	RPGKLGNGSS
C1te5	.....	.....	.....
C1teg4	MVATAASSAF	FPVPSADTSS	RPGKLGNGPS
C1teg16	MVAAAASSAF	FSFPTPGTSP	KPGKFGNWPSS
Pcr4_2	.....	.....	.....
C1te12	.....	.....	.....
C1teg1	MVAAAATSAF	FPVPAPGTTSP	KPGKSGNWPSS
Ucte	.....	.....	.....

51	Ctt <sub>e</sub> 2_1	VNSRGALPHS	RSVGFASIRK	RSTGSLCN..	SPPRTVAPVM	AVRTGEQPTG
	Ctt <sub>e</sub> 5_2	KDTTFALTHS	RSIGSVSIRR	RYNVFLCNSS	SSSRKVSPLL	AVATGEQPSG
	Bnt <sub>e</sub> 2	TNHLHTFSFF	SDSSLFIPVN	RRTLAVSSSQ	PRKPALDPLR	AVISADQQSI
	C1te13	SASAPPKING	SSVGLKSGSL	KTQEDTP..SV	PPPRTFINQL	PDWSMLLAAI
	C1teg7	SASAPPKING	SSVGLKSGSL	KTQEDTP..SV	PPPRTFINQL	PDWSMLLAAI
	C1te5	SASAPPKING	SSVGLKSGGL	KTHDDAP..SA	PPPRTFINQL	PDWSMLLAAI
	C1teg4	SASAPPKING	SSVGLKSGGL	KTHDDAP..SA	PPPRTFINQL	PDWSMLLAAI
	C1teg16	NASAHPKANG	SAVSLKAGSL	ETQEDTSAPS	PPPRTFINQL	PDWNMLLSAI
	Pcr42	...	...	...	...	...
	C1te12	...	...	...	...	...
	C1teg1	NASAHPKANG	SAVNLKSGSL	NTQEDTS..SS	PPPRAFLNQL	PDWSMLLTAI
	Ucte	RSSDLQLRAG	NA....PTSL	KMINGTKFSY	TES...	LKRL
						PDWSMLFAVI

5/16

101	Ctte2_1	VAVGL.....	KEAEA	EVEKSLADRL	RMGSLTEDGL	SYKERFIIRC
	Ctte5_2	VA. SL.....	READK	..EKSLGNRL	RLGSLTEDGL	SYKEKFVIRC
	Bnte2	SPVNS.....	CTP..	..ADRF	RAGRLMEDGY	SYKEKFIVRS
	Clte13	TTVFLAAEKQ	WMMLDWKPKR	..PDMLVDPF	GLGSIVQGGL	VFRQNFSIIRS
	C1teg7	TTVFLAAEKQ	WMMLDWKPKR	..PDMLVDPF	GLGSIVQGGL	VFRQNFSIIRS
	C1te5	TTAFLAAEKQ	WMMLDWKPKR	..LDMLEDPF	GLGRIVQDGL	VFRQNFSIIRS
	C1teg4	TTAFLAAEKQ	WMMLDWKPKR	..LDMLEDPF	GLGRIVQDGL	VFRQNFSIIRS
	C1teg16	TTVFVAAEKQ	WTMLDRKSKR	..SDVLVE..	..PYVQDGW	SFRQSFSIIRS
	Pcr42	.....	.....	.....	.....	.....
	C1te12	.....	.....	.....	.....	VRDGL
	C1teg1	TTVFVAAEKQ	WTMLDRKSKR	..PDMLVDSV	GLKSIIVRDGL	VSRQSFLIIRS
	Ucte	TTIFSAAEKQ	WTNLWPKPK	KLPQLLDDHF	GL.....HGL	VFRRTFAIRS

151	YEVGINKTAT	VETIANLLQE	VGGNHAQSVG	FSTDGFATT	TMRKLHLIWV
Ctte2_1	YEVGINKTAT	IETIANLLQE	VGGNHAQGVG	FSTDGFATT	TMRKLHLIWV
Ctte5_2	YEVGINKTAT	VETIANLLQE	VACNHVQKCG	FSTDGFATT	TMRKLHLIWV
BnTe2	YEVGINKTAT	IETVMNHLQE	TALNHVKSA	LLNDGFGRTP	EMFKRDLIWV
Clte13	YEIGADRTAS	IETVMNHLQE	TALNHVKSA	LLNDGFGRTP	EMFKRDLIWV
C1teg7	YEIGADRTAS	IETVMNHLQE	TALNHVKSA	LLNDGFGRTP	EMFKRDLIWV
C1te5	YEIGADRTAS	IETVMNHLQE	TALNHVKTAG	LSNDGFGRTP	EMYKRDLIWV
C1teg4	YEIGADRTAS	IETVMNHLQ.	...	...	...
C1teg16	YEIGADRTAS	IETLMNHLQE	TSLNHCKSLG	LLNDGFGRTP	EMCKRDLIWV
Pcr42	...	...	...	...	...
C1te12	YEIGADRTAS	IETLMNHLQE	TSINHCKSLG	LLNDGFGRTP	GMCKNDLIWV
C1teg1	YEIGADRTAS	IETLMNHLQE	TSINHCKSLG	LLNDGFGRTP	GMCKNDLIWV
Ucte	YEVGPDRTS	ILAVMNHMQE	ATLNHAKS	ILGDFGFTL	EMSKRDLMWV

6/16

201

201

250

Ctte2_1	TSRMHIEIYR	YPAWSDVVEI	ETWCQSEGRI	GTRRDWIMKD	HASGEVIGRA
Ctte5_2	TARMHIEIYR	YPAWSDVIEI	ETWVQGEGKV	GTRRDWILKD	YANGEVIGRA
Bnte2	TARMHIEIYK	YPAWSDVVEI	ETWCQSEGRI	GTRRDWILRD	SATNEVIGRA
Clte13	VAKMQVMVNR	YPTWGDTVEV	NTWVAKSGKN	GMRRDWLISD	CNTGEILTRA
C1teg7	VAKMQVMVNR	YPTWGDTVEV	NTWVAKSGKN	GMRRDWLISD	CNTGEILTRA
C1te5	VAKMQVMVNR	YPTWGDTVEV	NTWVAKSGKN	GMRRDWLISD	CNTGEILTRA
C1teg4	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
C1teg16	VTKMQVMVNR	YPTWGDTIEV	TTWVSESGKN	GMSRDWLLISD	CHSGEILIRA
Pcr42	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
C1te12	LTKMQIMVNR	YPTWGDTVEI	NTWFSQSCKI	GMASDWLISD	CNTGEILIRA
C1teg1	LTKMQIMVNR	YPTWGDTVEI	NTWFSQSCKI	GMASDWLISD	CNTGEILIRA
Ucte	VRRTHVAVER	YPTWGDTVEV	ECWIGASNN	GMRRDFLVRD	CKTGEILTRC

7/16

8/16

251	TSKWVMMNED	TRRLQKVND	VRDEYLVF	CP	KTPRLAFPEK	NTSSLKKIAK
Ctte2_1	TSKWVMMNED	TRRLQKVSD	VREEYLVF	CP	RTLRLAFPEE	NNNSMKKIPK
Ctte5_2	TSKWVMMNQD	TRRLQRVTD	VRDEYLVF	CP	REPLAFPEE	NNSSLKKIPK
Bnte2	SSVWVMMNQK	TRKLSKIPDE	VRHEIEPHFI	DCAPVII	..ED	DDRKLRLKLD.
C1te13	SSVWVMMNQK	TRKLSKIPGE	VRHEIEPHFI	DCAPVII	..ED	DDRKLRLKLD.
C1teg7	SSVWVMMNQK	TRKLSKIPDE	VRREIEPHFV	DSAPVII	..ED	DDRKLRLPKLD.
C1te5	SSVWVMMNQK	TRKLSKIPDE	VRREIEPHFV	DSAPVII	..ED	DDRKLRLPKLD.
C1teg4	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
C1teg16	TSVWAMMNQK	TRRLSKIPDE	VRQEIVPYFV	DSAPVII	..ED	DRKLHLKLD.
Pcr42	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
C1te12	TSVWAMMNQK	TRRFSRLPYE	VRQELTPHFV	DSPHVI	..ED	NDQKLHLKFD.
C1teg1	TSVWAMMNQK	TRRFSRLPYE	VRQELTPHFV	DSPHVI	..ED	NDQKLHLKFD.
Ucte	TSLSVLMNTR	TRRLSTIPDE	VRGEIGPAFI	DNVAVK	..DD	EIKKLQKLN.

301

Ctte2_1	LEDPAEYSTL	GLVPRRADLD	MNKHVNNVTVY	IGWVLESIPQ	EVIDTHELQT
Ctte5_2	LEDPAEYSRL	GLVPRRSLDL	MNKHVNNVTVY	IGWALESIPP	EIIDTHELQA
Bnte2	LEDPAQYSML	ELKPRRADLD	MNQHVNNVTVY	IGWVLESIPQ	EIIDTHELQV
Clte13	.EKTADSIRK	GLTPKWNLDL	VNQHVNNVVKY	IGWILESTPQ	EVLETQELSS
Clteg7	.EKTADSIRK	GLTPKWNLDL	VNQHVNNVVKY	IGWILESTPQ	EVLETQELSS
C1te5	.EKSADSIRK	GLTPRWNLDL	VNQHVNNVVKY	IGWILESTPP	EVLETQELCS
C1teg4	.VKTGDSIRN	GLTPRWNDFD	VNQHVNNVVKY	IAWLKSVPT	EVFETQELCG
C1teg16	.VKTGDSIRN	GLTPRWNDFD	VNQHVNNVVKY	IAWLKSVPT	EVFETQELCG
Pcr42	.VKTGDSIRN	GLTPRWNDFD	VNQHVNNVVKY	IAWLKSVPT	EVFETQELCG
C1te12	.VKTGDSIRK	GLTPRWNLDL	VNQHVSNVVKY	IGWILESMPI	EVLETQELCS
C1teg1	.VKTGDSIRK	GLTPRWNLDL	VNQHVSNVVKY	IGWILESMPI	EVLETQELCS
Ucte	.DSTADYIQC	GLTPRWNLDL	VNQHVNNLKY	VAWFETVPD	SIFESHIISS

301

350	9/16	9/16	9/16	9/16	9/16
LEDPAEYSTL	GLVPRRADLD	MNKHVNNVTVY	IGWVLESIPQ	EVIDTHELQT	
LEDPAEYSRL	GLVPRRSLDL	MNKHVNNVTVY	IGWALESIPP	EIIDTHELQA	
LEDPAQYSML	ELKPRRADLD	MNQHVNNVTVY	IGWVLESIPQ	EIIDTHELQV	
.EKTADSIRK	GLTPKWNLDL	VNQHVNNVVKY	IGWILESTPQ	EVLETQELSS	
.EKTADSIRK	GLTPKWNLDL	VNQHVNNVVKY	IGWILESTPQ	EVLETQELSS	
.EKSADSIRK	GLTPRWNLDL	VNQHVNNVVKY	IGWILESTPP	EVLETQELCS	
.VKTGDSIRN	GLTPRWNDFD	VNQHVNNVVKY	IAWLKSVPT	EVFETQELCG	
.VKTGDSIRN	GLTPRWNDFD	VNQHVNNVVKY	IAWLKSVPT	EVFETQELCG	
.VKTGDSIRN	GLTPRWNDFD	VNQHVNNVVKY	IAWLKSVPT	EVFETQELCG	
.VKTGDSIRK	GLTPRWNLDL	VNQHVSNVVKY	IGWILESMPI	EVLETQELCS	
.VKTGDSIRK	GLTPRWNLDL	VNQHVSNVVKY	IGWILESMPI	EVLETQELCS	
.DSTADYIQC	GLTPRWNLDL	VNQHVNNLKY	VAWFETVPD	SIFESHIISS	



11/16

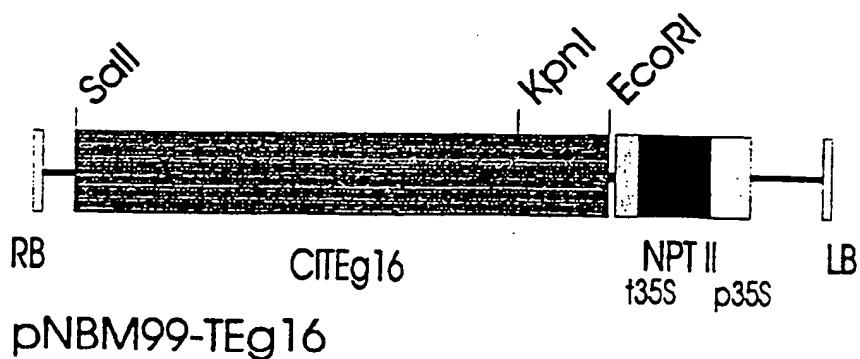
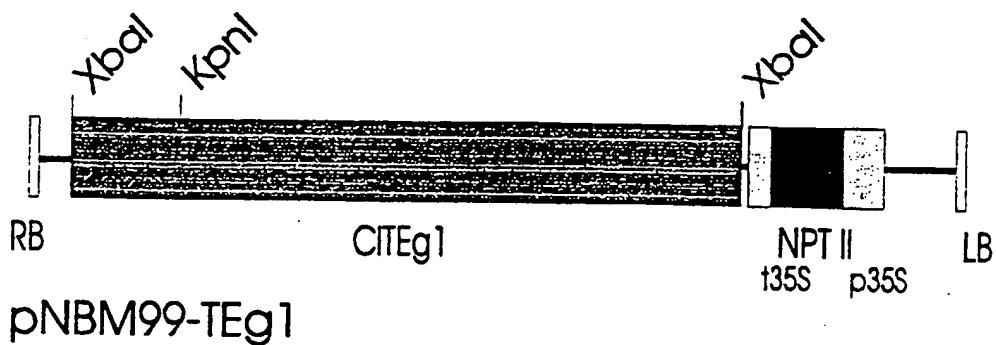
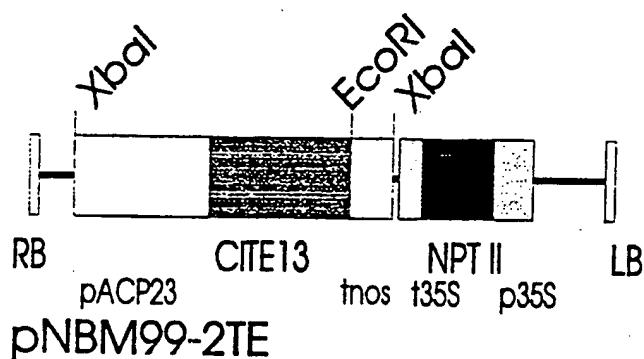
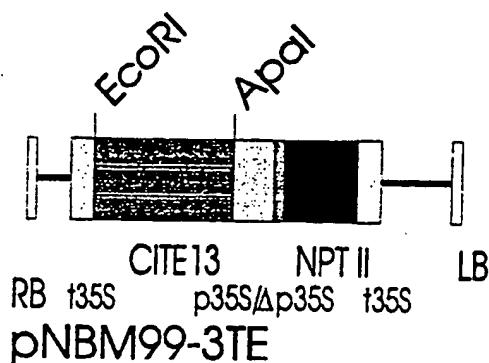
401

Ctte2_1	RFLHLLRSSG	DGLELNRGRT	EWRKKPAKK.	.....	.....	.....
Ctte5_2	RFMHLRLRSAG	SGLEINRCRT	EWRKKPAKR.	.....	.....	.....
Bnte2	QFLHMLRLSE	NGQEINNRGRT	QWRKKSSR.	.....	.....	.....
Clte13	QFQHLLRL.E	DGGEIVKGRT	EWRPKTAGVN	GAIASGETSH	GDS.	.....
C1teg7	QFQHLLRL.E	DGGEIVKGRT	EWRPKTAGVN	GAIASGETSH	GDS.	.....
C1te5	QFQHLLRL.E	DGGEIVKGRT	EWRPKNAGIN	GGVPSEES.	.....	.....
C1teg4	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C1teg16	LYQHLLRL.E	NGADIALGRT	EWRPKNAGAN	GAV..	STGKT	SNGNSVS
Pcr42	LYQHLLRL.E	NGADIALGRT	EWRPKNAGAN	GAV..	STGKT	SNGNSVS
C1te12	QYKHLLRL.E	DGTDIVKSRT	EWRPKNAGTN	GAISTSTAKT	SNGNSAS	.....
C1teg1	QYKHLLRL.E	DGTDIVKSRT	EWRPKNAGTN	GAISTSTAKT	SNGNSAS	.....
Ucte	VCDHLLQL.E	GGSEVLRART	EWRPKLTDSF	RGISVIPAEF	RV.	.....

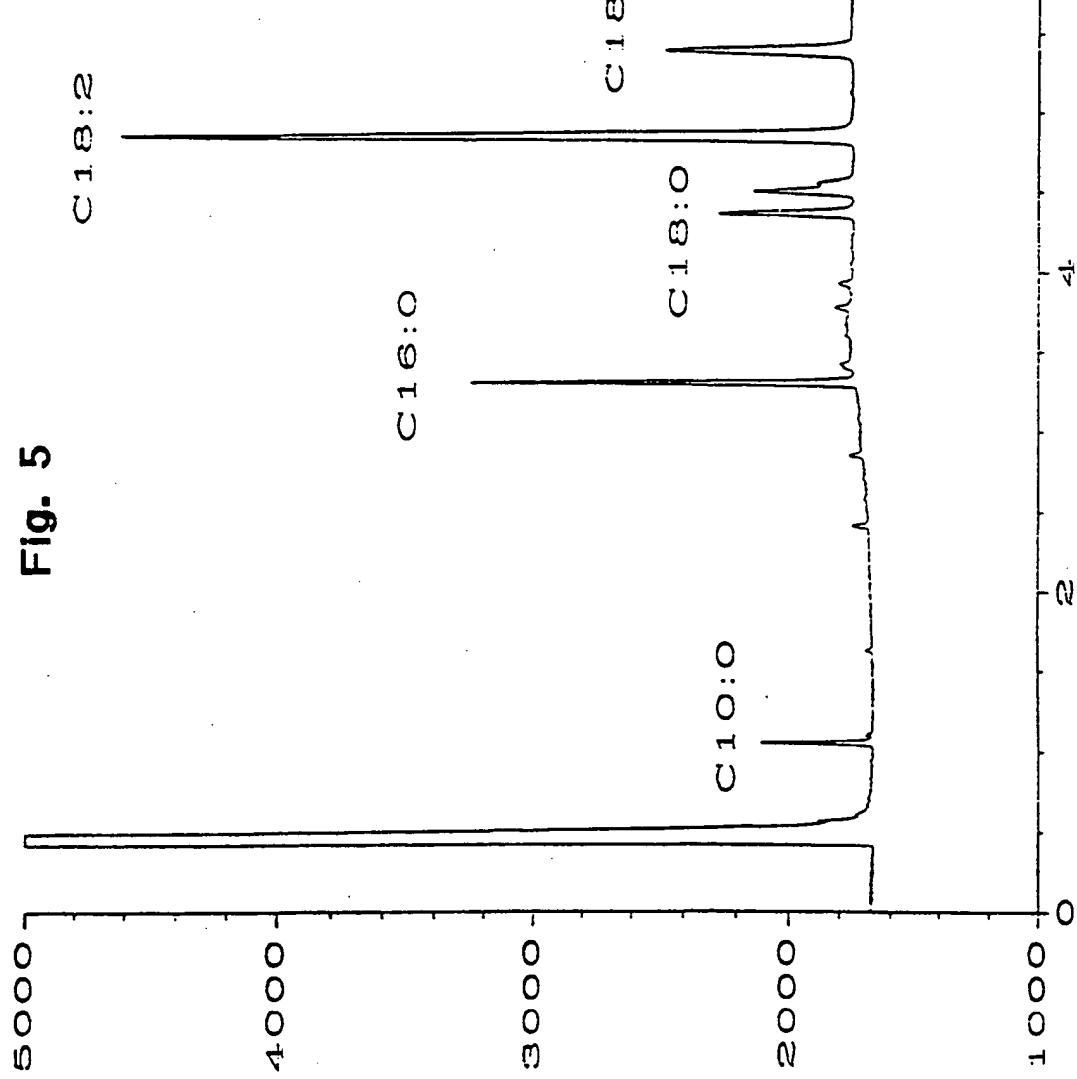
447

12/16

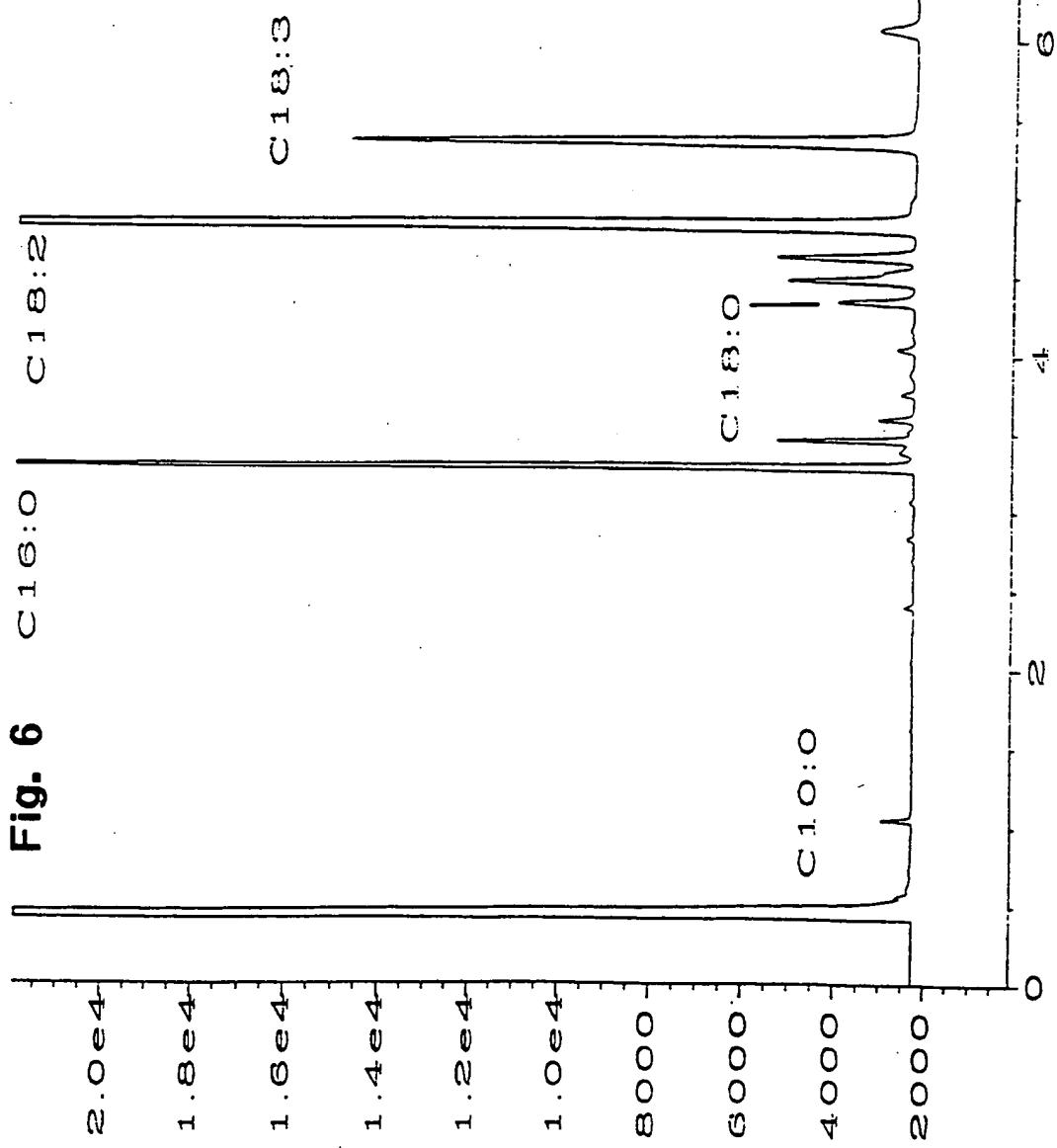
Fig. 4



13/16



14/16



15/16

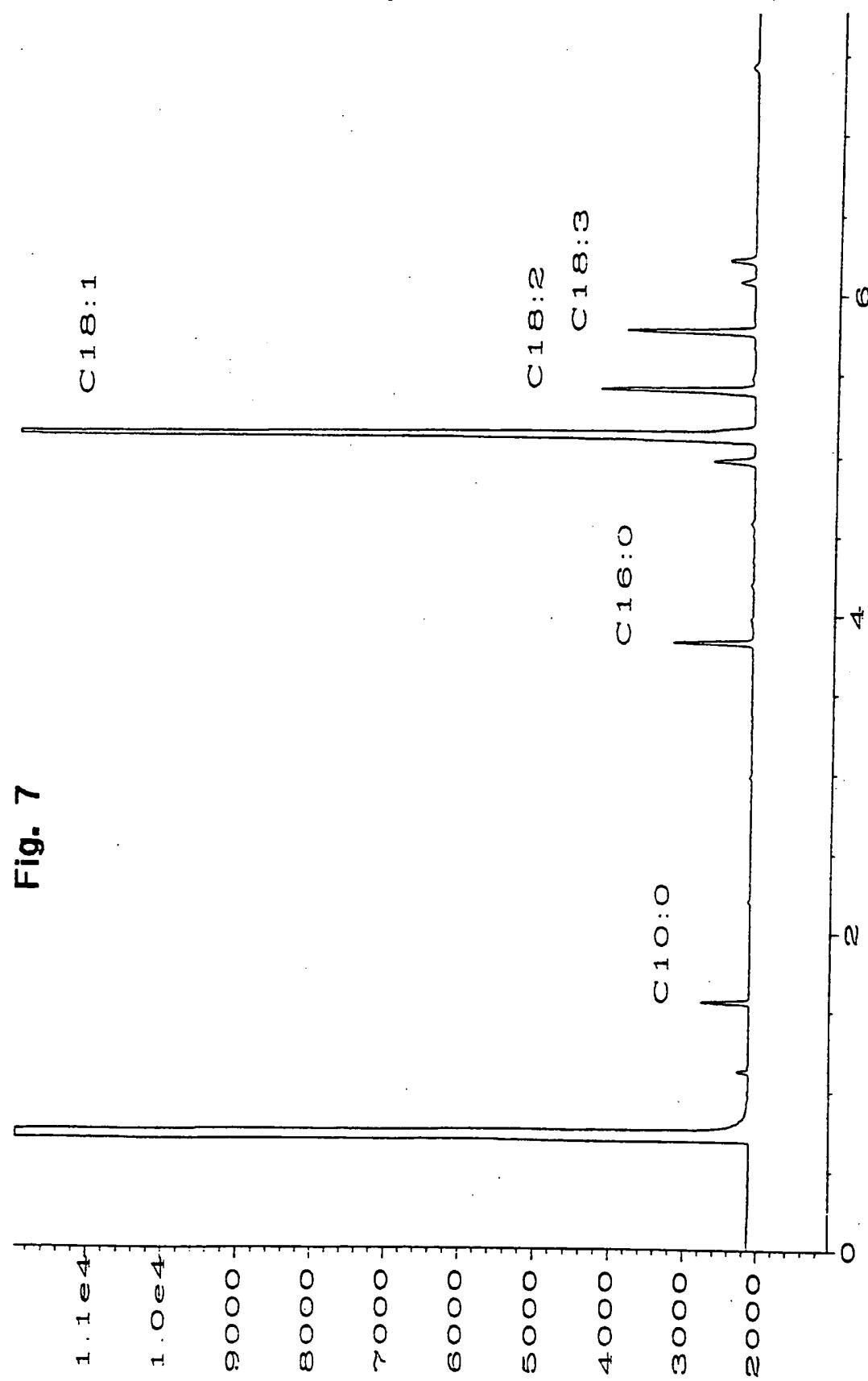
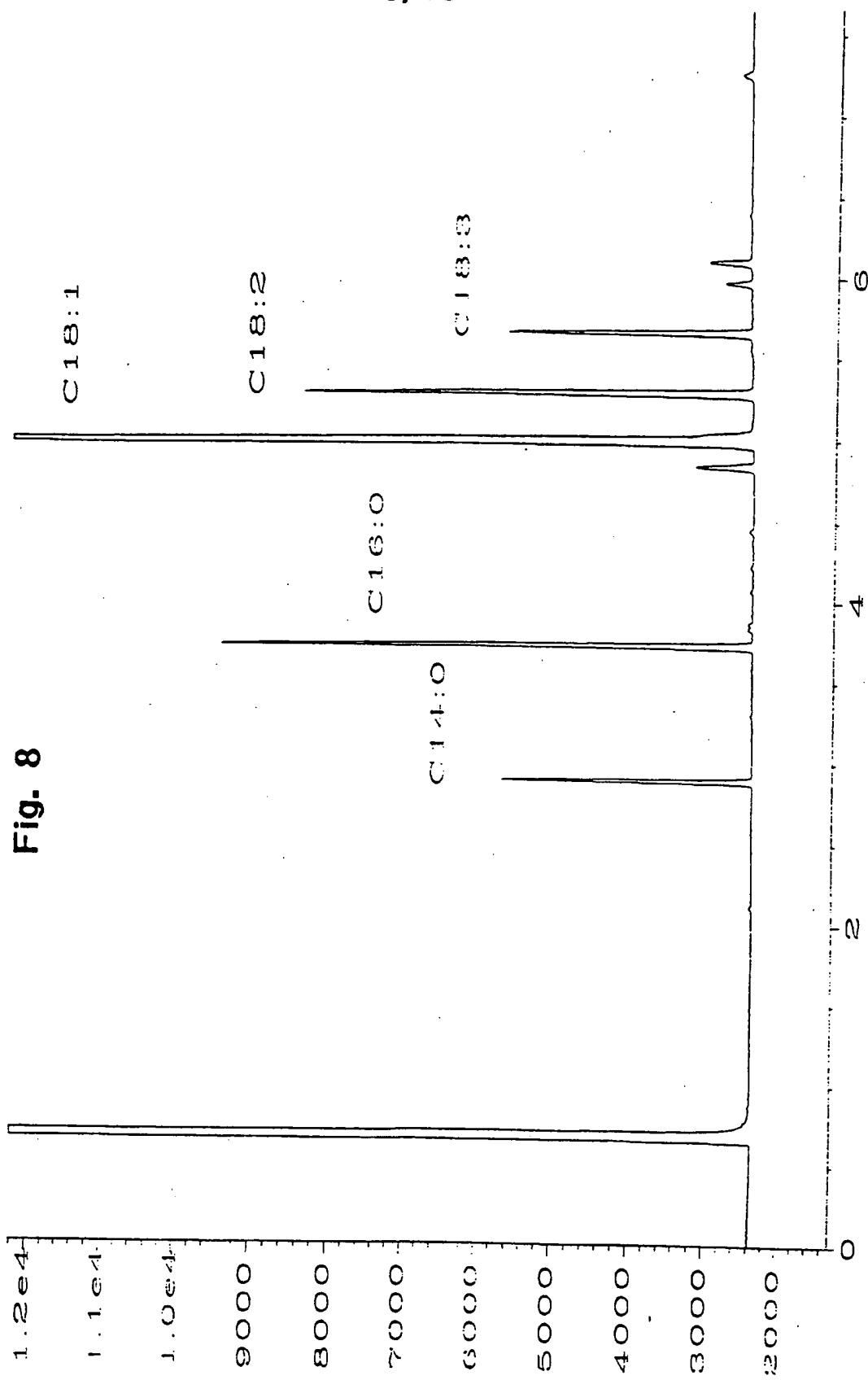


Fig. 7

16/16



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No  
PCT/EP 94/02935

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12N15/82 C12N15/55 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
O, X	BIOL. CHEM. HOPPE SEYLER, vol.367, no.8, August 1993 page 532 MÜLLER, A., ET AL. 'Isogenes of the thioesterase from Cuphea lanceolata' see abstract PL38 ---	1-3, 6-9
O, X	BIOL. CHEM. HOPPE SEYLER, vol.374, no.8, September 1993 page 531 MARTINI, N., ET AL. 'Thioesterase genes for the biosynthesis of medium chain fatty acids in seeds of Cuphea lanceolata' see abstract PL35 ---	1-3, 6-9
X	WO,A,92 11373 (DU PONT) 9 July 1992 see page 57, line 21 - page 60, line 6 ---	1-3, 6, 8, 9 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

11 May 1995

18.05.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.  
PCT/EP 94/02935

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.263, no.26, 15 September 1988, BALTIMORE, MD US pages 13393 - 13399 MIYAMOTO, C.M., ET AL. 'Organization of the lux structural genes of <i>Vibrio</i> <i>harveyi</i> ' see figures 6,10 ---	6,7
X	SCIENCE, vol.257, 3 July 1992, LANCASTER, PA US pages 72 - 74 VOELKER, T. A., ET AL. 'Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants' cited in the application see the whole document ---	1,2,14, 18,19,22
X	WO,A,92 20236 (CALGENE) 26 November 1992	1,2,14, 18,19,22
Y	see page 7, line 1 - line 7 see page 8, line 1 - line 10 ---	8
X	WO,A,91 16421 (CALGENE) 31 October 1991 cited in the application	1,2
Y	see page 6, line 24 - line 26 ---	8
P,X	WO,A,94 10288 (CALGENE) 11 May 1995 see page 25 - page 30 ---	1-4, 19-22
P,X	J. PLANT PHYSIOL., vol.143, 1994 pages 416 - 425 TÖPFER, R., ET AL. 'Molecular cloning of cDNAs or genes encoding proteins involved in de novo fatty acid biosynthesis in plants' see page 420, right column, last paragraph - page 421 ---	10
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 96 Philadelphia, PA, US; abstract no. 9558, DÖRMANN, P., ET AL. 'Characterization of two acyl-acyl carrier protein thioesterases from developing <i>Cuphea</i> seeds specific for medium-chain and oleoyl-acyl carrier protein' see abstract & PLANTA, vol.189, no.3, 1993 pages 425 - 432 ---	1-22
1		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	Application No
PCT/EP 94/02935	

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FETT WISSENSCHAFT TECHNOLOGIE, vol.93, no.11, November 1991 page 417</p> <p>SCHUCH, R., ET AL. 'Enzyme für die Synthese mittelkettiger Fettsäuren aus Cuphea lanceolata' see the whole document</p> <p>---</p>	1-22
E	<p>WO,A,95 07357 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT) 16 March 1995</p> <p>see seq. id's 31-34</p> <p>see page 18 - page 23</p> <p>-----</p>	1-22

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Internat	Application No
PCT/EP	94/02935

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9211373	09-07-92	AU-A- EP-A-	9116191 0563191	22-07-92 06-10-93
WO-A-9220236	26-11-92	EP-A- JP-T-	0557469 7501924	01-09-93 02-03-95
WO-A-9116421	31-10-91	US-A- US-A- EP-A- US-A-	5298421 5344771 0480024 5304481	29-03-94 06-09-94 15-04-92 19-04-94
WO-A-9410288	11-05-94	NONE		
WO-A-9507357	16-03-95	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen  
PCT/EP 94/02935

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/82 C12N15/55 A01H5/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)  
IPK 6 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
0,X	BIOL. CHEM. HOPPE SEYLER, Bd.367, Nr.8, August 1993 Seite 532 MÜLLER, A., ET AL. 'Isogenes of the thioesterase from Cuphea lanceolata' siehe Zusammenfassung PL38 ---	1-3,6-9
0,X	BIOL. CHEM. HOPPE SEYLER, Bd.374, Nr.8, September 1993 Seite 531 MARTINI, N., ET AL. 'Thioesterase genes for the biosynthesis of medium chain fatty acids in seeds of Cuphea lanceolata' siehe Zusammenfassung PL35 ---	1-3,6-9 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nabeliegend ist

\*'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
11. Mai 1995	18-05-1995
Name und Postanschrift der internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Maddox, A

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen  
PCT/EP 94/02935

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,92 11373 (DU PONT) 9. Juli 1992 siehe Seite 57, Zeile 21 - Seite 60, Zeile 6 ---	1-3,6,8, 9
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd.263, Nr.26, 15. September 1988, BALTIMORE, MD US Seiten 13393 - 13399 MIYAMOTO, C.M., ET AL. 'Organization of the lux structural genes of Vibrio harveyi' siehe Abbildungen 6,10 ---	6,7
X	SCIENCE, Bd.257, 3. Juli 1992, LANCASTER, PA US Seiten 72 - 74 VOELKER, T. A., ET AL. 'Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2,14, 18,19,22
X	WO,A,92 20236 (CALGENE) 26. November 1992	1,2,14, 18,19,22
Y	siehe Seite 7, Zeile 1 - Zeile 7 siehe Seite 8, Zeile 1 - Zeile 10 ---	8
X	WO,A,91 16421 (CALGENE) 31. Oktober 1991 in der Anmeldung erwähnt	1,2
Y	siehe Seite 6, Zeile 24 - Zeile 26 ---	8
P,X	WO,A,94 10288 (CALGENE) 11. Mai 1995 siehe Seite 25 - Seite 30 ---	1-4, 19-22
P,X	J. PLANT PHYSIOL., Bd.143, 1994 Seiten 416 - 425 TÖPFER, R., ET AL. 'Molecular cloning of cDNAs or genes encoding proteins involved in de novo fatty acid biosynthesis in plants' siehe Seite 420, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 421 ---	10
		-/-

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat:	z. Aktenzeichen
PCT/EP 94/02935	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 96 Philadelphia, PA, US; abstract no. 9558, DÖRMANN, P., ET AL. 'Characterization of two acyl-acyl carrier protein thioesterases from developing Cuphea seeds specific for medium-chain and oleoyl-acyl carrier protein' siehe Zusammenfassung & PLANTA, Bd.189, Nr.3, 1993 Seiten 425 - 432 ----	1-22
A	FETT WISSENSCHAFT TECHNOLOGIE, Bd.93, Nr.11, November 1991 Seite 417 SCHUCH, R., ET AL. 'Enzyme für die Synthese mittelkettiger Fettsäuren aus Cuphea lanceolata' siehe das ganze Dokument ----	1-22
E	WO,A,95 07357 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT) 16. März 1995 siehe seq. id's 31-34 siehe Seite 18 - Seite 23 -----	1-22

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 94/02935

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9211373	09-07-92	AU-A- EP-A-	9116191 0563191	22-07-92 06-10-93
WO-A-9220236	26-11-92	EP-A- JP-T-	0557469 7501924	01-09-93 02-03-95
WO-A-9116421	31-10-91	US-A- US-A- EP-A- US-A-	5298421 5344771 0480024 5304481	29-03-94 06-09-94 15-04-92 19-04-94
WO-A-9410288	11-05-94	KEINE		
WO-A-9507357	16-03-95	KEINE		